

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96199197.6

[43]公开日 1999年1月20日

[11]公开号 CN 1205755A

[22]申请日 96.12.20 [21]申请号 96199197.6

[30]优先权

[32]95.12.22 [33]US [31]60/009,198

[32]96.5.2 [33]US [31]60/016,729

[86]国际申请 PCT/US96/20635 96.12.20

[87]国际公布 WO97/23685 英 97.7.3

[85]进入国家阶段日期 98.6.19

[71]申请人 诺沃挪第克生物化学北美公司

地址 美国北卡罗来纳州

共同申请人 诺沃挪第克公司

[72]发明人 O·科特

M·巴弗德

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 用于纺织品染色的酶促方法

[57]摘要

本发明涉及使物质着色的方法,该方法包括(a)在包含一种或多种单-,二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物的水溶液中浸泡所说的物质;和(b)在水溶液中使用(i)过氧化氢源和表现出过氧化物酶活性的酶或(ii)对所说的一种或多种芳族或杂芳族化合物表示出氧化酶活性的酶处理浸湿的物质;其中所说的物质是由毛皮、兽皮、皮革、丝绸或羊毛制造的织物、纱线、纤维、衣服或薄膜。

权 利 要 求 书

1. 一种使物质着色的方法，该方法包括(a)在包含一种或多种单-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物的水溶液中浸泡所说的物质，每种这样的化合物可以是或不是被一个或多个官能团或取代基取代的，其中，每一个官能团或取代基选自由卤素、磺基、磺酸根合、磺氨基、硫烷基、氨基、酰氨基、硝基、偶氮基、亚氨基、羧基、氰基、甲酰基、羟基、卤羰基、氨基甲酰基、脲基、磷酸根合、磷酰基、C₁₋₁₈-烷基、C₁₋₁₈-链烯基、C₁₋₁₈-炔基、C₁₋₁₈-烷氧基、C₁₋₁₈-氧羰基、C₁₋₁₈-氧代烷基、C₁₋₁₈-烷基硫烷基、C₁₋₁₈-烷基磺酰基、由一个，二个或三个C₁₋₁₈烷基基团取代的C₁₋₁₈烷基亚氨基或氨基组成的组，其中的每一C₁₋₁₈-烷基、C₁₋₁₈-链烯基和C₁₋₁₈炔基基团可以是被前面的官能团或取代基单-, 二-或多取代的；和

(b)在水溶液中用(i)过氧化氢源和表现出过氧化物酶活性的酶或(ii)对所说的一种或多种芳族化合物或杂芳族化合物表现出氧化酶活性的酶处理浸湿的物质；其中所说的物质是由毛皮、兽皮、皮革、丝绸或羊毛制造的织物、纱线、纤维、衣服或薄膜。

2. 按照权利要求1的方法，其中所说的一种或多种单-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物是萘酚。

3. 按照权利要求1的方法，其中所说的一种或多种单-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物是芳族二胺。

4. 按照权利要求1的方法，其中所说的一种或多种单-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物是氨基苯酚。

5. 按照权利要求1的方法，其中所说的一种或多种单-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物是苯酚。

6. 按照权利要求1的方法，其中所说的物质是由毛皮制造的。

7. 按照权利要求1的方法，其中所说的物质是由兽皮制造的。

8. 按照权利要求1的方法，其中所说的物质是由皮革制造的。

9. 按照权利要求1的方法，其中所说的物质是由丝绸制造的。

10. 按照权利要求1的方法，其中所说的物质是由羊毛制造的。

11. 按照权利要求 1 的方法, 其中用对所说的一种或多种单-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物表现出过氧化物酶活性的酶和过氧化氢源处理浸湿的物质。

12. 按照权利要求 11 的方法, 其中所说的酶是过氧化物酶或卤过氧化物酶。

13. 按照权利要求 1 的方法, 其中用对所说的一种或多种单-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物表现出氧化酶活性的酶处理浸湿的物质。

14. 按照权利要求 13 的方法, 其中所说的酶选自由胆红素氧化酶、儿茶酚氧化酶、漆酶、邻-氨基苯酚氧化酶以及多酚氧化酶组成的组。

15. 按照权利要求 1 的方法, 其中对所说的物质进行染色的温度范围是约 5 °C 到约 120 °C。

16. 按照权利要求 1 的方法, 该方法还包括将选自由钠、钾、钙和镁离子组成的组的一价或二价离子加入到步骤(b)的水溶液中。

17. 按照权利要求 1 的方法, 该方法还包括将选自由聚乙烯吡咯烷酮, 聚乙烯醇, 聚天冬氨酸酯, 聚乙烯酰胺和聚环氧乙烷组成的组的聚合物加入到步骤(b)的水溶液中。

18. 按照权利要求 1 的方法, 该方法还包括将阴离子、非离子或阳离子表面活性剂加入到步骤(b)的水溶液中。

19. 按照权利要求 1 的方法, 其中在 pH2.5 - 12 下对物质进行染色。

20. 按照权利要求 1 的方法, 该方法还包括将增强酶活性的增强剂加入到步骤(b)的水溶液中。

21. 按照权利要求 1 的方法, 其中在步骤(a)和(b)中所用的水溶液是相同的。

说明书

用于纺织品染色的酶促方法

发明所属技术领域

本发明涉及染色物质的方法，该方法包括(a)在包含一种或多种单-、二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物的水溶液中浸泡所说的物质；和(b)在水溶液中用(i)过氧化氢源和表现出过氧化物酶活性的酶或(ii)对所说的一种或多种芳族或杂芳族化合物表示出氧化酶活性的酶处理浸湿的物质；其中所说的物质是由毛皮、兽皮、皮革、丝绸或羊毛制造的织物、纱线、纤维、衣服或薄膜。

发明背景

纺织品的染色经常被认为是在纺织品和衣服的制造中最重要和最昂贵的单一步骤。在纺织业中，目前有两种主要类型的工艺用于染色，即分批染色和连续染色。在分批工艺中，使用喷嘴、滚筒，以及还原染色器等。在连续工艺中，使用轧染系统等。参见，例如 I. D. Rattee、In C. M. Carr(Ed.)，"纺织品工业化学"，Blackie 学术和专业出版社，格拉斯哥，1995，p. 276。

染料的主要种类是偶氮染料(单-，二-，三-等)，蒽基染料(蒽醌和靛蓝衍生物)，花青染料，二-和三苯基甲烷和酞菁染料。所有这些染料都包含有产生颜色的发色团。有三种类型涉及氧化/还原机制的染料，即还原染料、硫化染料和偶氮染料。在这些染色中，氧化/还原步骤的目的在于使染料在可溶性形式和不溶性形式之间变化。

氧化还原酶(例如，氧化酶和过氧化物酶)是本领域熟知的。

一类氧化还原酶是漆酶(苯二酚:氧氧化还原酶)，它们是包含多酮的酶，其催化酚类和相关化合物的氧化。漆酶介导的氧化作用导致从合适底物产生芳香基中间产物，这些中间产物的最终偶联给出二聚反应产物、寡聚反应产物和多聚反应产物的结合体。这些反应本质上对生物合成途径重要，它们已被用于生产各种天然产物和合成材料。

成。

另一类氧化还原酶是在过氧化氢存在下氧化化合物的过氧化物酶。

对于染发来说，发现漆酶是有用的。参见，例如 PCT 申请 No. PCT/US 95/06815 和 PCT/US95/06816。欧洲专利 No. 0504005 公开了漆酶可以用于在 6.5 和 8.0 之间的 pH 范围对毛织物染色。

Saunders 等，过氧化物酶，伦敦，1964，p.10 ff 公开了过氧化物酶作用于各种氨基化合物和酚化合物，导致颜色的产生。

日本专利申请出版物 No. 6-316874 公开了对棉花进行染色的一种方法，这种方法包括用包含氧的介质处理棉花，其中氧化还原酶选自由抗坏血酸氧化酶、胆红素氧化酶、过氧化氢酶、漆酶、过氧化物酶和多酚氧化酶组成的组，这些酶用于产生氧。

WO 91/05839 公开了氧化酶和过氧化物酶对抑制纺织物染料的转移是有用的。

本发明的目的是提供一种对纺织品织物进行染色的酶促方法。

发明概要

本发明涉及一种使物质着色的方法，该方法包括(a)在包含一种或多种单-、二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物的水溶液中浸泡所说的物质，每种这样的化合物可以是或不是被一个或多个官能团或取代基取代的，其中，每一个官能团或取代基选自由卤素、磺基、磺酸根合、磺氨基、硫烷基、氨基、酰氨基、硝基、偶氮基、亚氨基、羧基、氰基、甲酰基、羟基、卤羰基、氨基甲酰基、脲基、膦酸根合、膦酰基、C₁₋₁₈-烷基、C₁₋₁₈-链烯基、C₁₋₁₈-炔基、C₁₋₁₈-烷氧基、C₁₋₁₈-氧羰基、C₁₋₁₈-氧代烷基、C₁₋₁₈-烷基硫烷基、C₁₋₁₈-烷基磺酰基、由一个，二个或三个 C₁₋₁₈ 烷基基团取代的 C₁₋₁₈-烷基亚氨基或氨基组成的组；和(b)在水溶液中用(i)过氧化氢源和表现出过氧化物酶活性的酶或(ii)对所说的一种或多种芳族化合物或杂芳族化合物表现出氧化酶活性的酶处理浸湿的物质；其中所说的物质是由毛皮、兽皮、皮革、丝绸或羊毛制造的织物、纱线、纤维、衣服或薄膜。

1-氨基-4-二-(b-羟乙基)-氨基苯(N, N-二-(b-羟乙基)-对-苯二胺),
2-甲基-1, 3-二氨基-苯(2, 6-二氨基甲苯),
2, 4-二氨基甲苯,
2, 6-二氨基吡啶,
1-氨基-4-磺酸根合-苯,
1-N-甲基磺酸根合-4-氨基苯,
1-甲基-2-羟基-4-氨基-苯(3-氨基邻-甲酚),
1-甲基-2-羟基-4-b-羟乙基氨基-苯(2-羟基-4-羟基乙氨基-甲苯),
1-羟基-4-甲基氨基-苯(对-甲基氨基苯酚),
1-甲氧基-2, 4-二氨基-苯(2, 4-二氨基苯甲醚),
1-乙氧基-2, 3-二氨基-苯(2, 4-二氨基苯乙醚),
1-b-羟乙氧基-2, 4-二氨基-苯(2, 4-二氨基苯氧基乙醇),
1, 3-二羟基-2-甲基苯(2-甲基间苯二酚),
1, 2, 4-三羟基苯,
1, 2, 4-三羟基-5-甲基苯(2, 4, 5-三羟基甲苯),
2, 3, 5-三羟基甲苯,
4, 8-二磺酸根合-1-萘酚,
3-磺酸根合-6-氨基-1-萘酚(J 酸),
6, 8-二磺酸根合-2-萘酚,
1, 4-苯二胺,
2, 5-二氨基甲苯,
2-氯代-1, 4-苯二胺,
2-氨基酚,
3-氨基酚,
4-氨基酚,
1, 3-苯二胺,
1-萘酚,
2-萘酚,
4-氯代间苯二酚,
1, 2, 3-苯二酚(1, 2, 3-苯三酚)

1, 3-苯二酚(间苯二酚),
1, 2-苯二酚(邻苯二酚),
2-羟基-肉桂酸,
3-羟基-肉桂酸,
4-羟基-肉桂酸,
2, 3-二氨基苯甲酸,
2, 4-二氨基苯甲酸,
3, 4-二氨基苯甲酸,
3, 5-二氨基苯甲酸,
2, 3-二氨基苯甲酸甲酯,
2, 3-二氨基苯甲酸乙酯,
2, 3-二氨基苯甲酸异丙酯,
2, 4-二氨基苯甲酸甲酯,
2, 4-二氨基苯甲酸乙酯,
2, 4-二氨基苯甲酸异丙酯,
3, 4-二氨基苯甲酸甲酯,
3, 4-二氨基苯甲酸乙酯,
3, 4-二氨基苯甲酸异丙酯,
3, 5-二氨基苯甲酸甲酯,
3, 5-二氨基苯甲酸乙酯,
3, 5-二氨基苯甲酸异丙酯,
N, N-二甲基-3, 4-二氨基苯甲酸酰胺,
N, N-二乙基-3, 4-二氨基苯甲酸酰胺,
N, N-二丙基-3, 4-二氨基苯甲酸酰胺,
N, N-二丁基-3, 4-二氨基苯甲酸酰胺,
4-氯代-1-萘酚,
N-苯基-对-苯二胺,
3, 4-二羟基苯甲醛,
吡咯,
吡啶-2-亚胺

1, 2, 3-三唑,
苯并三唑,
苯并咪唑,
咪唑,
吡唑,
1-氨基-8-羟基萘-4-磺酸(S 酸),
4, 5-二羟基萘-2, 7-二磺酸(铬变酸),
邻氨基苯甲酸,
4-氨基苯甲酸(PABA),
2-氨基-8-萘酚-6-磺酸(咖马酸),
5-氨基-1-萘酚-3-磺酸(M 酸),
2-萘酚-3, 6-二磺酸(R 酸),
1-氨基-8-萘酚-2, 4-二磺酸(芝加哥酸),
1-萘酚-4-磺酸(奈温酸),
迫位酸,
N-苯甲酰基 J 酸,
N-苯基 J 酸,
1, 7-克列氏酸,
1, 6-克列氏酸,
Bon 酸,
萘酚 AS ,
分散黑 9 ,
萘酚 AS OL ,
萘酚 AS PH ,
萘酚 AS KB ,
萘酚 AS BS ,
萘酚 AS D ,
萘酚 AS B1 ,
媒染剂黑 3CI 14640(羊毛铬蓝绿 B),
1-氨基-5-羟基-2, 6-萘二磺酸(H 酸)

油性棕 RR 溶剂棕 1(CI 11285),

对苯二酚,

苯乙醇酸,

三聚氰胺,

邻-硝基苯甲醛,

1, 5-二羟基萘,

2, 6-二羟基萘,

2, 3-二羟基萘,

苕基咪唑,

2, 3-二氨基萘,

1, 5-二氨基萘,

1, 8-二氨基萘,

水杨酸,

3-氨基水杨酸,

4-氨基水杨酸,

5-氨基水杨酸,

甲基-3-氨基水杨酸酯,

甲基-4-氨基水杨酸酯,

甲基-5-氨基水杨酸酯,

乙基-3 氨基水杨酸酯,

乙基-4-氨基水杨酸酯,

乙基-5-氨基水杨酸酯,

丙基-3-氨基水杨酸酯,

丙基-4-氨基水杨酸酯,

丙基-5-氨基水杨酸酯,

水杨酰胺,

4-氨基苯硫酚,

4-羟基苯硫酚,

苯胺,

4, 4' - 二氨基 - 二苯砜砧砧

4-苯基偶氮苯胺,
4-硝基苯胺,
N,N-二甲基-1,4-苯二胺,
N,N-二乙基-1,4-苯二胺,
分散橙 3,
分散黄 9,
分散蓝 1,
N-苯基-1,2-苯二胺,
6-氨基-2-萘酚,
3-氨基-2-萘酚,
5-氨基-1-萘酚,
1,2-苯二胺,
2-氨基嘧啶,
4-氨基嘧啶,
2-硝基苯胺,
3-硝基苯胺,
2-氯代苯胺,
3-氯代苯胺,
4-氯代苯胺,
4-(苯基偶氮)间苯二胺(苏丹橙 G, CI 11920),
苏丹红 B, CI 26110,
苏丹红 7B, CI 26050,
4'-氨基-N-乙酰苯胺,
1,2-二羟基蒽醌,
1-蒽胺(1-氨基蒽),
1-氨基蒽醌,
蒽醌,
2,6-二羟基蒽醌,
1,5-二羟基蒽醌(蒽降酚),
2-氨基其叶啉(尼古叶啉)

吡啶-3-羧酸(烟酸),
 媒染剂黄 1, 茜素黄 GG, CI, 14025 ,
 考马斯灰, 酸性黑 48, CI 65005 ,
 宫殿坚牢黑, WAN, 酸性黑 52, CI 15711 ,
 宫殿铬黑, 6BN, CI 15705, 羊毛铬蓝黑 R ,
 媒染剂黑 11, 羊毛铬黑 T ,
 萘酚蓝黑, 酸性黑 1, CI 20470 ,
 1, 4-二羟基蒽醌(醌西),
 4-羟基香豆素,
 散形酮, 7-羟基香豆素,
 七叶亭, 6, 7-二羟基香豆素,
 香豆素,
 铬变素 2B 酸性红 176, CI 1657 ,
 铬变素 2R 酸性红 29, CI 16570 ,
 铬变素 FB 酸性红 14, CI 14720 ,
 2, 6-二羟基异尼克酸, 柠檬酸,
 2, 5-氯代苯胺,
 2-氨基-4-氯代甲苯,
 2-硝基-4-氯代甲苯,
 2-甲氧基-4-硝基苯胺和,
 对-溴苯酚。

在含有一种或多种单一-, 二-或多环芳族或杂芳族化合物的水溶液中浸泡所说的物质后, 在水溶液中用过氧化氢源和表现出过氧化物酶活性的酶或一种或多种芳族或杂芳族化合物表现出氧化酶活性的酶处理所说的物质。在一个优选的实施方案中, 用同样的水溶液浸泡和染色所说的物质。在本发明方法中用于染色所说的物质的水溶液, 即染液可以具有在约 0.5:1 到约 200:1 , 优选地在约 5:1 到约 20:1 范围的水/物质比率。

在本发明的方法中, 一种或多种单一-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物可以是以下物质氧化的: (a)过氧化氢源和表现出过氧化物酶活性的酶或 (b) 对一种或多种单一-, 二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物(例如, 苯胺

和相关底物)表现出氧化酶活性的酶。表现出过氧化物酶活性的酶包括(但不限于)过氧化物酶(EC 1.11.1.7)和卤代过氧化物酶,例如氯代-(EC 1.11.1.10),溴代-(EC 1.11.1.1)和碘代过氧化物酶(EC 1.11.1.8)。表现出氧化酶活性的酶包括(但不限于)胆红素氧化酶(EC 1.3.3.5),儿茶酚氧化酶(EC 1.10.3.1),漆酶(EC 1.10.3.2),邻-氨基苯酚氧化酶(EC 1.10.3.4)和多酚氧化酶(EC 1.10.3.2)。用于测定这些酶活性的分析方法是本领域技术人员熟知的。

优选地,这种酶是从选自下组的微生物获得的漆酶:曲霉属、葡萄孢属、金钱霉属、香菇属、毁丝霉属、链孢霉属、灰侧菌属、束柄霉属、多孔菌属、*Scytalidium*、栓菌属以及丝核菌属。在更优选的实施方案中,这种漆酶是从选自下组的微生物获得的: *Humicola brevis* var. *thermoidea*, *Humicola brevispora*, 灰腐质霉 *thermoidea* 变种, *Humicola insolens* 和 *Humicola lanuginosa* (也称为 *Thermomyces lanuginosus*), *Myceliophthora thermophila*, *Myceliophthora vellerea*, *Polyporus pinsitus*, *Scytalidium thermophila*, *Scytalidium indonesiacum* 和嗜热色串孢。该漆酶也可以从蛾柱霉属的其他物种获得,例如 *Scytalidium acidophilum*, *Scytalidium album*, *Scytalidium aurantiacum*, *Scytalidium circinatum*, *Scytalidium flaveobrunneum*, *Scytalidium hyalinum*, *Scytalidium lignicola* 和 *Scytalidium uredinicolum*。该漆酶也可以从多孔菌属的其他物种获得,例如环纹多孔菌, *Polyporus alveolaris*, *Polyporus arcularius*, *Polyporus australiensis*, *Polyporus badius*, 二形多孔菌, 冬生多孔菌, *Polyporus ciliatus*, *Polyporus colensoi*, *Polyporus eucalyptorum*, *Polyporus meridionalis*, 黑柄多孔菌, *Polyporus palustris*, 喜根多孔菌, *Polyporus rugulosus*, 鳞多孔菌, 茎形多孔菌和 *Polyporus tumulosus*。该漆酶也可以从丝核菌属的物种获得,例如茄属丝核菌。这种漆酶也可以是在 I 型(T1)铜位点上被至少一个氨基酸残基修饰的修饰漆酶,其中这种修饰的氧化酶具有相对于野生型氧化酶的改变的 pH 和/或比活性。例如,修饰漆酶能够在 T1 铜位点的片段(a)上被修饰。

可以用于本发明的过氧化物酶可以从植物中分离出来并且可由植物产生(例如转植过氧化物酶)或由微生物(如真菌或细菌)由公知途径并且可由其

生物产生。一些优选的真菌包括属于半知菌亚门丝孢纲的菌株，例如镰刀菌属、腐质霉属、木霉属、漆斑菌属、轮枝孢属、*Arthromyces*、卡尔黑霉属、*Ulocladium*、*Embellisia*、枝孢属或 *Dreschlera*，特别是尖镰孢 (DSM 2672)、*Humicola insolens*、黑氏木霉、疣孢漆斑菌 (IFO 6113)、棉黄萎轮枝孢、大丽花轮枝孢、*Arthromyces ramosus* (FERM P-7754)，烟色卡尔黑霉、*Ulocladium chartarum*、*Embellisia alli* 或 *Dreschlera halodes*。

其它优选的真菌包括属于担子菌亚门，担子菌纲的菌株，例如鬼伞属、展齿革菌属、革盖菌属或栓蕈属、特别是灰盖鬼伞 *f. microsporus* (IFO 8371)、长根鬼伞，*Phanerochaete chrysosporium* (如 NA-12) 或杂色革盖菌 (如 PR428-A)。

更优选的真菌包括属于接合菌亚门，圆孔腔菌科的菌株，例如，根霉属或毛霉属，特别是冻土毛霉。

一些优选的细菌包括属于放线菌目的菌株，例如嗜热紫链霉菌 (IFO 12382)，浑球链霉菌 (ATCC 23965) 或 *Streptoverticillum Verticillium ssp. verticillium*。

其它优选的细菌包括短小芽孢杆菌 (ATCC 12905)，嗜热脂肪芽孢杆菌，球形红细菌，*Rhodomonas palustri*，乳链球菌，*Pseudomonas purrocinia* (ATCC 15958) 或荧光假单胞菌 (NRRL B-11)。

B.C. Saunders 等，同上 pp.41-43 中列出了过氧化物酶其它潜在的来源。

文献中描述了按照本发明所使用的酶的生产方法。例如，FEBS 通信，1625, 173(1)，应用环境微生物学，1985年2月，pp.273-278，应用微生物生物技术 26, 1987, pp.158-163，生物技术通信 9(5)，1987, pp.357-360，自然 326, 1987年4月2日 FEBS 通信 4270, 209(2), p.321，EP 179 486，EP 200 565，GB 2 167 421，EP 171 074 和农业生物化学 50(1)，1986, p.247。

特别优选的酶是那些 pH 在约 2.5 到约 12.0 范围内有活性的酶，优选的是在约 4 到约 10 范围内，最优选的是在约 4.0 到约 7.0 范围内和约 7.0 到约 10.0 范围内。可以通过筛选嗜碱微生物产生的如上的酶来生产过氧化物酶。例

如, 使用在 R.E.Childs 和 W.G.Bardsley, 生物化学杂志, 145, 1975, pp.93-103 中描述的 ABTS 测定法。

其它优选的酶是那些表现出良好的热稳定性以及对通常所使用的染色添加剂(如非离子、阳离子或阴离子表面活性剂、螯合剂、盐、聚合物等)良好的稳定性的酶。

所说酶也可以经以下方法产生, 该方法包括在使得这种酶可以表达的条件下, 在培养基中培养用重组 DNA 载体转化过的宿主细胞, 并从培养液中回收所说的酶, 其中所说的载体携带有编码所说的酶的 DNA 序列以及编码使得编码该酶的 DNA 序列可以表达的功能的 DNA 序列。

例如编码所说的酶的 DNA 片段可以通过建立产生这种兴趣酶的微生物(如前面提到的一种微生物)的 cDNA 或基因组文库和通过常规方法(如与以这种酶的整个或部分氨基酸序列为基础合成的寡核苷酸探针杂交或选择表达合适的酶活性的克隆或选择产生与天然酶的抗体反应性的蛋白质的克隆)筛选阳性克隆来分离。

一旦被选择, 就可以将 DNA 序列插入到包含恰当的启动子、操纵子和终止子序列(允许酶在特定的宿主生物中表达)以及复制起点(能使载体在正被讨论的宿主微生物中复制)的合适的可复制的表达载体中。

然后, 将所形成的表达载体转化到合适的宿主细胞, 例如真菌细胞中, 优选的例子是曲霉属的菌种, 最优选的是米曲霉或黑曲霉。通过牵涉到原生质体形成和转化的过程, 接着是细胞壁再生用已知的方法转化真菌细胞。曲霉属作为宿主微生物的应用在 EP 238 023(Novo Industri A/S 的)中已经描述过, 本文一并参考。

另外, 宿主生物体可以是细菌, 特别是链霉菌属, 芽孢杆菌属或大肠杆菌的菌株。通过常规方法可以完成细菌细胞的转化, 例如通过在 T.Maniatis 等, 分子克隆: 实验室手册、冷泉港, 1982 所描述的方法。

通过标准方法(参见 T.Maniatis 等, 同上)也可以进行合适 DNA 序列的筛选和载体的构建。

用于培养转化的宿主细胞的培养基可以是适合于正被讨论的宿主细胞生长的任何常规培养基。所表达的酶可以方便地分泌到培养基中, 并且可以用众所周知的方法从中回收。这一方法包括用离心法或过滤法以分离其

中分离出细胞,借助盐(如硫酸铵)沉淀出蛋白质组分;接着采用色谱方法(如采用离子交换色谱法,亲和色谱法或类似的方法)回收这种酶。

当本发明所采用的酶是过氧化物酶时,必须使用过氧化氢源,如过氧化氢本身。过氧化氢源在方法的开始或中间可以以 0.001-5mM 的量添加,特别是以 0.01-1mM 的量添加。

一种过氧化氢源包括过氧化氢的前体,例如过硼酸盐或过碳酸盐。另一种过氧化氢源包括能够使分子氧和有机或无机底物分别转化成过氧化氢和氧化底物的酶。这些酶仅仅产生低水平的过氧化氢,但是由于过氧化物酶的存在确保了产生的过氧化氢的有效利用,因而这些酶在本发明方法中发挥了很大的作用。能够产生过氧化氢的酶的例子包括(但不限于)葡萄糖氧化酶、尿酸氧化酶、半乳糖氧化酶、醇氧化酶、胺氧化酶、氨基酸氧化酶和胆固醇氧化酶。

在本发明方法中,染色物质所使用的温度范围是约 5 到约 120 °C,优选的范围是约 5 到约 80 °C,更优选的范围是约 15 到约 70 °C; pH 范围是约 2.5 到约 12,优选的是在约 4 到约 10 之间,更优选的范围是约 4.0 到约 7.0 或约 7.0 到约 10.0。更优选地,使用低于 6.5 的 pH (例如 pH 范围为 3 - 6,优选的是 4 - 6,更优选的是 4.5-5.5)或高于 8.0 的 pH (例如 pH 范围为 8 - 10,优选的是 8.5 - 10,最优选的是 9 - 10)。令人惊奇的是,用本发明的方法在 pH 低于 6.5 和高于 8.0 下物质被染上的颜色与用本发明的方法在 pH 6.5-8.0 下同样物质被染上的颜色不同。在最优选的实施方案中,分别使用邻近酶的最适温度和最适 pH 的温度和 pH。

在一个优选的实施方案中,本发明方法还包括将一价或二价离子,聚合物和表面活性剂(10mg-5g/l)加入到水溶液中,这些离子包括(但不限于)钠、钾、钙和镁离子(0-3M,优选地为 25mM-1M),这些聚合物包括(但不限于)聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚天冬氨酸酯、聚乙烯酰胺、聚环氧乙烷(0-50g/l,优选地为 1-500mg/l)。

这些表面活性剂的例子是如羧酸盐之类的阴离子表面活性剂,例如长链脂肪酸的金属羧酸盐; N-酰基肌氨酸盐; 磷酸与脂肪族醇乙氧基化物的单酯或二酯或这些酯的盐; 如十二烷基硫酸钠、十八烷基硫酸钠或十六烷基硫酸钠的脂肪族醇硫酸盐; γ -烷基化的脂肪族醇硫酸盐; γ -烷基化的烷基

酚硫酸盐；木素磺酸盐；石油磺酸盐；如烷基苯磺酸盐或低级烷基萘磺酸盐(如丁基-萘磺酸盐)的烷基芳基磺酸盐；盐或磺酸化萘-甲醛缩合物；磺酸化的酚-甲醛缩合物的盐；或如酰胺磺酸盐的更复杂的磺酸盐(例如油酸和 N-甲基牛磺酸的磺酸化缩合产物或二烷基磺基琥珀酸酯(例如，磺酸钠，或二辛基琥珀酸酯))。这些表面活性剂的其他例子是如脂肪酸酯、脂肪族醇、脂肪酸酰胺或脂肪族烷基-或链烯基取代酚类与环氧乙烷的缩合产物，环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物，炔属二醇类(如 2,4,7,9-四乙基-5-癸炔-4,7-二醇)，或乙氧基炔属二醇类的非离子表面活性剂。这样的表面活性剂的其他例子是如脂肪族单-，双-或多胺(如乙酸酯、环烷酸酯或油酸酯)，含氧胺类(如聚氧乙烯烷基胺的胺氧化物)，通过羧酸与二或多胺的缩合制备的连接酰胺的胺类，或季铵盐之类的阳离子表面活性剂。

在另一优选实施方案中，本发明的方法还包括将提高表现出过氧化物酶活性的酶的活性或表现出氧化酶活性的酶的活性的增强剂加入到水溶液中。增强剂是本领域已知的。例如，已知在 WO 95/01426 中公开的有机化合物可增强漆酶的活性。此外，已知在 WO94/12619 和 WO94/12621 中公开的化合物可增强过氧化物酶的活性。

下列非限制性实施例进一步说明本发明。

实施例

实施例 1

漆酶活性的测定

在有氧条件下氧化丁香醛连氮来测定漆酶活性。用分光光度法在 530nm 处测量生成的紫罗兰色。分析条件是：19 μ M 丁香醛连氮，23.2mM 乙酸盐缓冲液(pH5.5)，30 $^{\circ}$ C，以及 1 分钟反应时间。一个漆酶单位(LACU)是指在上述条件下每分钟催化 1 微摩尔丁香醛连氮的转化所需要的漆酶的量。

过氧化物酶活性的测定

一个过氧化物酶单位(POXU)指在下列分析条件下每分钟催化 1 微摩尔过氧化氢的转化所需要的酶量：0.88mM 过氧化氢，1.67mM 2,2'-连氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸酯)，0.1M 磷酸盐缓冲液(包含 Triton X 405(1.5g/1000ml))，pH7.0，30 $^{\circ}$ C 下混合。在 418nm 处测定吸光度(ADTS

的消光系数设定在 3.6l/mmol*mm)。

织物的染色

将 5mg 第一种化合物(对-苯二胺(“A”), 对-甲苯二胺(“B”), 或邻-氨基苯酚(“C”))和 5mg 第二种化合物(间-苯二胺(“D”), α -萘酚(“E”)或 4-氯代间苯二酚(“F”))(或 10mg 实验中的第一种化合物而没有第二种化合物)溶解在 10ml 0.1M K_2HPO_4 缓冲溶液(pH 7.0)中。将具有 71.7 LACU/ml 活性的 *Polyporus pinsitus* 漆酶(“PpL”)(保藏在真菌菌种保藏中心, 保藏号为 CBS 678.70)或具有 690 LACU/ml 活性的 *Myceliophthora thermophila* 漆酶(“MtL”)(保藏在真菌菌种保藏中心, 保藏号为 CBS 117.65)用同样的缓冲液稀释成 10 LACU/ml 活性。

将从 Test Fabrics Inc.(Middlesex , 新泽西)得到的多纤维布样样式 10A(4×10cm)卷起放到试管中。这种布样包含由棉花、双乙酸酯、聚丙烯酸、聚酰胺和聚酯制造的不同纤维的条。将 4.5ml 前体/成色剂溶液和 1ml 漆酶溶液添加到所说的试管中。将试管封住、混合并且安装在试管摇动器上, 在黑暗的柜橱中温育 60 分钟。在温育之后, 将布样在连续的热自来水中冲洗约 30 秒。

下列表中提供了本实验的结果:

表 1

织物	只有 A	A + D	A + E	A + F
羊毛	灰褐色	深蓝色	深紫色	褐色

表 2

织物	只有 A	B + D	B + E	B + F
羊毛	褐色	深蓝色	蓝褐色	黄/褐色

表 3

织物	只有 C	C+D	C+E	C+F
羊毛	橙/红	深橙/红	深橙	深橙

本实验结果表明在前体和 *Polyporus pinsitus* 漆酶存在下羊毛被染上颜色。以 *Myceliophthora thermophila* 漆酶获得类似的结果。

实施例 2

在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器(“LOM”)中,在 pH 4-10 范围内 30 ℃ 下对各种物质染色 1 小时。所染的物质(都是从 Test Fabrics Inc.获得的)是精纺羊毛(样式 526, 7cm×7cm)和氯化精纺羊毛(样式 530, 7cm×7cm)。

通过混合溶液 A(0.1M H_3PO_4 , 0.1M CH_3COOH , 0.1M H_3BO_3)和溶液 B(0.5M NaOH)在合适的 pH 下制备 0.1M 的 Britten-Robinson 缓冲溶液。为了制得 pH 分别为 4, 5, 6, 7, 8, 9 和 10 的缓冲溶液,将 806ml, 742ml, 706ml, 656ml, 624ml, 596ml 和 562ml 的溶液 A 用溶液 B 稀释到 1 升。

以 0.5mg/ml 的量将选自对-苯二胺, 邻-氨基苯酚和间-苯二胺的化合物添加到 75ml 每种缓冲溶液中。如果必要的话,检测和调整 pH。将 75ml 缓冲液/化合物溶液混合成各 150ml 的缓冲液/化合物混合溶液,并将这种混合溶液添加到 LOM 烧杯中。

然后,将所说物质的布样浸泡在每种缓冲液/化合物混合溶液中。接下来抽取相应于将要添加的漆酶的体积的体积。将具有 690LACU/ml 活性的 *Myceliophthora thermophila* 漆酶(“MtL”)用缓冲溶液稀释成 300LACU/ml 活性。在每种 pH(除 pH7.0 以外)的溶液中添加 2 LACU/ml 的酶。供定量给料分布之用,在 pH7.0 下,向溶液中添加 0, 1, 2 和 4 LACU/ml 的酶。然后将 LOM 烧杯安装在 LOM 中。在 30 ℃, 42 RPM 下 1 小时后,停止 LOM。倒掉液体,同时在烧杯中用连续去离子水冲洗布样约 15 分钟。干燥布样,利用 ColorEye 7000 仪器测量 CIELAB 值。在表 4-7 中给出了 CIELAB 结果。

表 4

用前体对 - 苯二胺和间 - 苯二胺染色

(pH-分布, 2LACU/ml)

		pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
精纺羊毛	L [*]	41.57	28.21	20.25	14.73	18.94	35.06	13.52
	a [*]	2.71	1.24	0.43	1.63	3.56	-1.92	1.79
	b [*]	-0.75	-2.09	-5.76	-5.84	-17.52	-14.05	-4.28
氯化羊毛	L [*]	18.46	16.05	15.04	14.19	15.47	31.44	13.84
	a [*]	2.32	1.01	0.88	1.83	2.78	-3.05	2.97
	b [*]	0.09	0.87	1.03	1.53	-11.43	-13.27	2.06

表 5

用前体对 - 苯二胺和间 - 苯二胺染色

(剂量分布 - pH7)

		0 LACU	1 LACU	4 LACU
精纺羊毛	L [*]	54.97	14.52	14.27
	a [*]	1.48	1.55	1.49
	b [*]	1.26	-6.09	-5.6
氯化羊毛	L [*]	43.2	14.42	14.33
	a [*]	1.79	1.75	1.69
	b [*]	1.61	1.5	1.65

表 6

用前体邻 - 氨基苯酚和间 - 苯二胺染色 (pH - 分布, 2LACU/ml)

		pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
精纺羊毛	L [*]	33.68	33.05	35.96	37.42	42.55	59.24	49.65
	a [*]	3.77	5.35	8.56	10.07	8.75	10.53	8.63
	b [*]	8.26	11.05	18.83	22.33	22.82	37.2	34.81
氯化羊毛	L [*]	21.07	19.11	21.01	24.7	34.42	59.9	48.74
	a [*]	3.14	2.77	4.82	7.22	6.88	10.08	10.4
	b [*]	4.23	4.31	8.04	12.64	18.08	36.78	34.76

表 7

用前体邻-氨基苯酚和间-苯二胺染色(剂量分布 - pH7)

		0 LACU	1 LACU	4 LACU
精纺羊毛	L*	80.23	38.57	36.18
	a*	1.1	9.21	10.8
	b*	20.09	21.33	22.76
氯化羊毛	L*	77.36	27.1	26.33
	a*	0.86	7.92	6.92
	b*	19.53	14.8	13.5

这些表中所用的参数“L”、“a”和“b”用来量化颜色，并且为颜色科学领域中的普通技术人员所熟知。参见例如，Billmeyer 和 Saltzman, 颜色技术原理，第二版，John Wiley 和 Sons，纽约，1981，p.59。

结果表明，精纺羊毛和氯化精纺羊毛在所有 pH 下均被染色，由对-苯二胺和间-苯二胺的混合液染色，得到的深颜色范围从低 pH 下的灰色到高 pH 下的海蓝色和黑色，而由邻-氨基苯酚和间-苯二胺的混合液染色，得到的颜色范围从低 pH 下的褐色到高 pH 下的橙/黄色。

在所有的定量给料实验中，没有从定量给料 1，2 或 4 LACU/ml 中看到显著的区别。0LACU/ml 的对照实验清楚地表明了这种漆酶催化染色过程。

实施例 3

除了本实验仅仅在 pH 5.0 和 8.0 下时间间隔为 0，5，15，35 和 55 分钟外，使用实施例 2 所描述的方法测定供染色的时间分布。在每个实验中，添加 2LACU/ml *Myceliophthora thermophila* 漆酶。表 8-11 显示了实验结果。

表 8

用前体对-苯二胺和间-苯二胺染色

时间分布，2LACU/ml, pH5

		0 min	5 min	15 min	35 min	55 min
精纺羊毛	L*	76.48	52.03	36.3	27.02	26.56
	a*	0.02	1.35	1.96	1.3	1.18
	b*	8	-0.02	-1.39	-1.68	-2.03
氯化羊毛	L*	63.73	19.23	16.81	16.48	16.75
	a*	0.1	1.86	1.28	0.77	1.11
	b*	10.3	-0.68	0.49	1.04	1.03

表 9
用前体对 - 苯二胺和间 - 苯二胺染色
时间分布, 2LACU/ml, pH8

		0 min	5 min	15 min	35 min	55 min
精纺羊毛	L*	64.43	23.66	14.57	13.11	13.06
	a*	-3.03	1.05	2.14	1.49	1.2
	b*	-3.32	-15.45	-8.72	-4.52	-3.68
氯化羊毛	L*	58.96	17.36	14.09	13.89	13.66
	a*	-1.66	0.57	1.9	2.71	2.64
	b*	2.68	-3.98	0.14	2.21	1.99

表 10
用前体邻 - 氨基苯酚和间 - 苯二胺染色
时间分布, 2LACU/ml, pH5

		0 min	5 min	15 min	35 min	55 min
精纺羊毛	L*	79.4	50.67	35.94	32.4	32.89
	a*	1.54	6.47	7.11	6.08	5.98
	b*	16.02	20.88	18.43	14.28	12.52
氯化羊毛	L*	76.72	39.53	22.12	18.82	19.58
	a*	2.33	6.81	4.21	2.88	3.1
	b*	18.26	16.48	8.23	4.89	4.77

表 11
用前体邻 - 氨基苯酚和间 - 苯二胺染色
时间分布, 2LACU/ml, pH8

		0 min	5 min	15 min	35 min	55 min
精纺羊毛	L*	80.06	63.03	49.37	42.51	41.24
	a*	1.63	15.71	17.1	12.32	9.97
	b*	25.87	43.37	38.69	30.26	25.78
氯化羊毛	L*	79.6	62.87	47.88	36.72	33.62
	a*	0.57	13.17	14.46	10.26	7.88
	b*	24.63	41.64	34.34	24.47	19.7

结果显示大多数颜色在头 15 分钟内形成。精纺羊毛和氯化精纺羊毛在两种 pH 下被染色。

实施例 4

在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器(“LOM”)中 pH5.5 下于 30 ℃ 染色 1 小时, 所染的物质(都是从 Test Fabrics, Inc. 获得的)是精纺羊毛(样式 526 , 8cm×8cm)。

以合适量的 0.1M CH₃COONa 缓冲液(pH5.5)溶解所说的化合物来制备 0.5mg/ml 的第一种化合物(对-苯二胺, “A”)溶液和 0.5mg/ml 的第二种化合物(L-萘酚, “B”)溶液。每个 LOM 烧杯使用 100ml 总体积。一个烧杯添加 100ml “A”, 另一个烧杯添加 50ml “A”和 50ml “B”混合形成 100ml 。将上文列出的物质的布样用 DI 水浸湿并在前体溶液中浸透。具有 690LACU/mg(80LACU/mg)活性的 *Myceliophthora thermophila* 漆酶(“MtL”)以 12.5mg/l 的浓度添加到每个烧杯中。将 LOM 烧杯密封并安装在 LOM 中。在 30 ℃, 42RPM 下 1 小时后, 停止 LOM 。倒掉废液并且将布样在冷自来水下冲洗约 15 分钟。在室温下干燥布样, 使用 Macbeth ColorEye 7000 测定所有布样的 CIELAB 值。结果在表 12 和表 13 给出:

表 12 - 用前体对-苯二胺染色(pH5.5, 12.5mg/l MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	30.93	61.66	10.10

表 13 - 用前体 p-苯胺和 1-萘酚染色(pH5.5, 12.5mg/l MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	30.70	61.12	-4.28

结果显示使用前体和 *Myceliophthora thermophila* 漆酶可以对羊毛进行染色(用 A 表示褐色, 而用 A/B 表示紫色)。

实施例 5

在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器(“LOM”)中, 在 pH5.5 下于 30 ℃ 染色 1 小

时。所染的物质(都是从 Test Fabrics, Inc.获得的)是精纺羊毛(样式 526, 8cm × 8cm)。

以合适量的 0.1M CH₃COONa 缓冲液(pH5.5)溶解所说的化合物来制备 0.5mg/ml 的第一种化合物(对-苯二胺, “A”)溶液和 0.5mg/ml 的第二种化合物(1-萘酚, “B”)溶液。每个 LOM 烧杯使用 100ml 的总体积。一个烧杯中添加 100ml“A”, 另一个烧杯中添加 50ml“A”和 50ml“B”, 混合形成 100ml。将上文列出的物质的布样在 DI 水中浸湿并在前体溶液中浸透。将具有 70 LACU/ml(100LACU/mg)活性的 *Polyporus pinstus* 漆酶(“PpL”)以 12.5mg/l 的浓度添加到每个烧杯中。将 LOM 烧杯密封并安装在 LOM 中。在 30 ℃, 42RPM 下 1 小时后停止 LOM。倒掉废液, 并且将布样在冷自来水下冲洗约 15 分钟。室温下干燥布样, 使用 Macbeth ColorEye 7000 测定所有布样的 CIELAB 值。其结果在表 14 和表 15 中给出。

表 14 - 用前体对-苯二胺染色(pH5.5, 12.5mg/l PpL)

	L*	a*	b*
羊毛	36.06	70.46	8.49

表 15 - 用前体对-苯二胺和 1-萘酚染色(pH 5.5, 12.5mg/l PpL)

	L*	a*	b*
羊毛	37.92	58.71	2.23

结果显示使用前体和 *Polyporus Pinsitus* 漆酶可以对羊毛进行染色(用 A 表示褐色, 而用 A/B 表示紫色)。

实施例 6

在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器(“LOM”)中, 在 pH5.5 下于 30 ℃对物质染色 1 小时, 所染的物质(都是从 Test Fabrics, Inc.获得的)是精纺羊毛(样式 526, 8cm × 8cm)。

以合适量的 0.1M CH₃COONa 缓冲液(pH5.5)溶解所说的化合物来制备 0.5mg/ml 的第一种化合物(对-苯二胺, “A”)溶液和 0.5mg/ml 的第二种化合物(1-萘酚, “B”)溶液。每个 LOM 烧杯使用 100ml 的总体积。一个烧杯中添加 100ml“A”, 另一个烧杯中添加 50ml“A”和 50ml“B”, 混合形成 100ml。将上文列出的物质的布样在 DI 水中浸湿再在前体溶液中浸透。将

具有 0.04LACU/mg(1 mg/ml)活性的 *Myrothecium verrucaria* 胆红素氧化酶 (“BiO”)以 12.5mg/l 的浓度添加到每只烧杯中。将 LOM 烧杯密封并安装在 LOM 中。在 30 ℃, 42RPM 下经过 1 小时后停止 LOM。倒掉废液, 并且将布样在冷自来水下冲洗约 15 分钟。室温下干燥布样, 使用 Macbeth ColorEye 7000 测定所有布样的 CIELAB 值。结果在表 16 和表 17 中给出。

表 16 - 用前体对-苯二胺染色

	L*	a*	b*
羊毛	27.54	80.84	-2.13

表 17 - 用前体对-苯二胺和 1-萘酚染色

	L*	a*	b*
羊毛	40.21	87.73	13.47

结果表明使用前体和胆红素氧化酶可以对羊毛进行染色(用 A 表示褐色, 而用 A/B 表示紫色)。

实施例 7

在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器(“LOM”)中, 在 pH5.5 下于 30 ℃对物质染色 1 小时, 所染的物质(都是从 Test Fabrics, Inc.获得的)是精纺羊毛(样式 526, 8cm × 8cm)。

以合适量的 0.1M CH₃COONa 缓冲液(pH5.5)溶解所说的化合物来制备 0.5mg/ml 的第一种化合物(对-苯二胺, “A”)溶液和 0.5mg/ml 的第二种化合物(1-萘酚, “B”)溶液。每个 LOM 烧杯使用 100ml 的总体积。一个烧杯中添加 100ml“A”, 另一个烧杯中添加 50ml“A”和 50ml“B”, 混合形成 100ml。将上文列出的物质的布样在 DI 水中浸湿再在前体溶液中浸透。将具有 5.2 LACU/mg(2mg/ml)活性的立枯丝核菌漆酶(“RsL”)以 12.5mg/l 的浓度添加到每只烧杯中。将 LOM 烧杯密封并安装在 LOM 中。在 30 ℃, 42RPM 下经过 1 小时后停止 LOM。倒掉废液, 并且将布样在冷自来水下冲洗约 15 分钟。室温下干燥布样, 使用 Macbeth ColorEye 7000 测定所有布样的 CIELAB 值。结果在表 18 和表 19 中给出。

表 18 - 用前体对-苯二胺染色(pH5.5, 12.5mg/l RsL)

	L*	a*	b*
羊毛	27.89	58.97	1.59

表 19 - 用前体对-苯二胺和 1-萘酚染色(pH5.5, 12.5mg/l RsL)

	L*	a*	b*
羊毛	29.03	63.94	-3.65

结果显示使用前体和立枯丝核菌漆酶可以对羊毛进行染色(用 A 表示褐色, 而用 A/B 表示紫色)。

实施例 8

在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器(“LOM”)中, 在 pH5.5 下于 60 ℃ 进行染色, 所染的物质(从 Test Fabric Inc.得到)是精纺羊毛(样式 526, 8cm × 8cm)。

以合适量的 2g/L CH₃COONa 缓冲液(pH5.5)溶解所说的化合物来制备 0.25mg/ml 的第一种化合物(对-苯胺, “A”)溶液和 0.25mg/ml 的第二种化合物(2-氨基苯酚, “B”)溶液。每个 LOM 烧杯使用 100ml 的总体积。一个 LOM 烧杯中添加 50ml “A”和 50ml “B”, 混合形成 100ml。将上文列出的物质的布样在 DI 中浸湿, 再在前体溶液中浸透。将 LOM 烧杯密封并安装在 LOM 中。在 LOM(42RPM)中温育 10 分钟后, 停止 LOM 并且将具有 690 LACU/ml (80LACU/mg) 活性的 *Myceliophthora thermophila* 漆酶 (“MtL”)以 1LACU/ml 的浓度添加到这只烧杯中。在 60 ℃, 42 RPM 下 50, 45 或 30 分钟后, 停止 LOM 并撤除样品。将前体溶液, 布样和酶添加到 LOM 烧杯中, 制得两个没有经过预温育的对照。将这两只烧杯安装在 LOM 中。在 60 ℃, 42RPM 下 30 分钟后, 撤除一个烧杯。另一个对照在 60 ℃, 42RPM 下经过总计 60 分钟后撤除。倒掉废液, 并将样品和布样在冷自来水下冲洗约 15 分钟。室温下干燥布样, 使用 Macbeth ColorEye 7000 测定所有布样的 CIELAB 值。结果在表 20-24 中给出。

表 20 - 用前体 A 和 B 对照染色, 0 分钟/30 分钟

	L*	a*	b*
羊毛	36.26	2.01	7.28

表 21 - 用前体 A 和 B 对照染色, 0 分钟/60 分钟

	L*	a*	b*
羊毛	36.49	2.28	7.42

表 22 - 用前体 A 和 B 染色, 10 分钟/50 分钟

	L*	a*	b*
羊毛	32.95	2.41	10.16

表 23 - 用前体 A 和 B 染色, 15 分钟/45 分钟

	L*	a*	b*
羊毛	33.20	2.65	10.80

表 24 - 用前体 A 和 B 染色, 30 分钟/30 分钟

	L*	a*	b*
羊毛	33.45	2.87	11.59

利用美国纺织化学家和着色师协会(AATCC)测试方法 61-1989, 2A 估计这些布样对清洗的耐色牢度(耐洗牢度)。将洗涤槽-O-计量器预热到 49 ℃, 同时将 200 ml 0.2% AATCC 标准参考去污剂 WOB(不含光学增白剂)和 50 个钢球放置到每个 LOM 烧杯中。将这些烧杯密封并安装在 LOM 中, 在 42RPM 下运行 2 分钟预热这些烧杯至试验温度。停止旋转并松开烧杯。将布样添加到烧杯中, LOM 运行 45 分钟。撤走烧杯, 并且将布样在热自来水中在偶然挤榨下冲洗 5 分钟。然后在室温下干燥并用 Macbeth ColorEye 7000 评估这些布样。利用 AATCC 评估法 1(色变的灰度)指定每种布样的灰度等级(1-5)。结果在表 25-29 中给出。

表 25 - 对 A 和 B 的耐洗牢度结果, 0 分钟/30 分钟

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	40.10	2.06	3.53	3

表 26 - 对 A 和 B 的耐洗牢度结果, 0 分钟/60 分钟

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	39.93	2.27	4.25	3

表 27 - 对 A 和 B 的耐洗牢度结果, 15 分钟/45 分钟

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	36.02	2.70	4.93	3-4

表 28 - 对 A 和 B 的耐洗牢度结果, 10 分钟/50 分钟

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	35.09	2.62	4.45	4

表 29 - 对 A 和 B 的耐洗牢度结果, 30 分钟/30 分钟

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	35.86	2.89	5.38	4

结果显示, 利用前体和 *Myceliophthora thermophila*(MtL)漆酶, 羊毛能够染上色。从 L*和灰度分级二者都可以明显地看出, 添加酶前在前体溶液中温育这些布样可以提高颜色强度和耐洗牢度。

实施例 9

将羊毛在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器(“LOM”)中, 在 pH5.5 下, 于 40 ℃ 染色 1 小时。所染的物质(都是从 Test Fabrics Inc.获得的)是精纺羊毛(样式 526, 7cm × 7cm)和氯化精纺羊毛(样式 530, 7cm × 7cm)。

在这个实验中评估两个介体, 将每个溶解在缓冲液中。三种缓冲溶液是: 2g/L CH₃COONa, pH5.5 缓冲液(“1”), 2g/L CH₃COONa, pH5.5, 包含 100μM 10-丙酸-吩塞嗪(PPT)(“2”)的缓冲液(“2”), 2g/L CH₃COONa, pH5.5, 包含 100μM 丁香酸甲酯的缓冲液(“3”)。

将所说的化合物溶解在合适量的缓冲液(1, 2 或 3)中来制备三种 0.25mg/ml 的第一种化合物(对-苯二胺, “A”)溶液和三种 0.25mg/ml 的第二种化合物(间-苯二胺, “B”)溶液。每个 LOM 烧杯使用 120ml 的总体积。将 60ml A 和 60ml B 混合成 120ml (对于每种缓冲液: 1, 2 或 3)。将上文列出的物质的布样在 DI 水中浸湿, 再在前体溶液中浸透。将 LOM 烧杯密封并安装在 LOM 中。在 40 ℃, 于 42RPM 下经过 10 分钟后停止 LOM。将具有 690 LACU/ml(80 LACU/mg)活性的 *Myceliophthora*

thermophila 漆酶(“MtL”)以 0.174LACU/ml 活性添加到每只烧杯中。再次将烧杯密封并安装在 LOM 中。在 40 ℃， 42RPM 下运行 50 分钟。撤走烧杯，倒掉废液并且将这些布样在冷自来水中冲洗约 15 分钟。室温下干燥布样，使用 Macbeth ColorEye 7000 测定所有布样的 CIELAB 值。结果在表 30， 31 和 32 中给出。

表 30 - 用前体 A 和 B 染色
(2g/L CH₃COONa， pH5.5， MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	47.93	0.45	-0.05
氯化羊毛	27.80	2.94	-0.06

表 31 - 用前体 A 和 B 染色
(2g/L CH₃COONa， pH5.5， 100μM PPT， MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	42.11	1.52	-5.95
氯化羊毛	24.48	2.76	-2.15

表 32 - 用前体 A 和 B 染色
(2g/L CH₃COONa， pH5.5， 100μM 丁香酸甲酯， MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	47.83	0.99	-0.14
氯化羊毛	25.77	3.37	-0.99

利用美国纺织化学家和着色师协会(AATCC)测试方法 61-1989， 2A 估计这些布样对清洗的耐色牢度(耐洗牢度)。将洗涤槽-O-计量器预热到 49 ℃， 将 200ml 0.2%AATCC 标准参考去污剂 WOB(不含光学增白剂)和 50 个钢球放置到每个 LOM 烧杯中。将这些烧杯密封并安装在 LOM 中， 在 42RPM 下运行 2 分钟预热这些烧杯至试验温度。停止旋转并松开烧杯。将布样添加到烧杯中使 LOM 运行 45 分钟。撤走烧杯并且将布样在热自来水中在偶然挤榨下冲洗 5 分钟。然后在室温下干燥， 并用 Macbeth ColorEye 7000 评估这些布样。利用 AATCC 评估方法 1(色变的灰度)指定每种布样的灰度等级(1-5)。结果在表 33 - 35 中给出。

表 33 - 对前体 A 和 B 的耐洗牢度结果(2g/L CH₃COONa, pH5.5, MtL)

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	50.59	1.11	7.07	3-4
氯化羊毛	31.74	2.83	7.09	3

表 34 - 对前体 A 和 B 的耐洗牢度结果
(2g/L CH₃COONa , pH5.5 ,100μM PPT , MtL)

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	48.38	-0.48	4.61	2-3
氯化羊毛	31.56	1.06	4.86	2

表 35 - 对前体 A 和 B 的耐洗牢度结果
(2g/L CH₃COONa , pH5.5 ,100μM PPT , MtL)

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	52.02	0.06	6.59	3
氯化羊毛	32.17	2.02	6.08	2-3

重复同样的实验,只是使用第三种化合物(2-氨基苯酚,“C”)和第四种化合物(间-苯二胺,“D”)。使用的温度为 50 ℃。结果在表 36-41 中给出。

表 36 - 用前体 C 和 D 染色
(2g/L CH₃COONa , pH5.5 , MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	53.52	5.92	18.19
氯化羊毛	47.79	4.73	17.08

表 37 - 用前体 C 和 D 染色
(2g/L CH₃COONa , pH5.5 , 100μM PPT , MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	52.38	6.70	21.84
氯化羊毛	46.86	5.55	17.87

表 38 - 用前体 C 和 D 染色

(2g/L CH₃COONa, pH5.5, 100μM 丁香酸甲酯, MtL)

	L*	a*	b*
羊毛	57.09	8.10	24.44
氯化羊毛	48.69	7.82	19.40

表 39 - 对前体 C 和 D 的耐洗牢度结果

(2g/L CH₃COONa, pH5.5, MtL)

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	57.38	7.23	10.97	3
氯化羊毛	51.35	7.04	13.16	3

表 40 - 对前体 C 和 D 的耐洗牢度结果

(2g/L CH₃COONa, pH5.5, 100μM PPT, MtL)

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	51.37	8.18	12.33	5
氯化羊毛	46.86	5.55	17.87	2

表 41 - 对前体 C 的耐洗牢度结果

(2g/L CH₃COONa, pH5.5, 100μM 丁香酸甲酯, MtL)

	L*	a*	b*	灰度等级
羊毛	59.61	7.24	11.89	4
氯化羊毛	50.01	7.94	14.38	4-5

这两组实验结果表明, 介体可以被用于染色和获得提高的耐洗牢度。在两组实验中, 精纺羊毛和氯化精纺羊毛在 CH₃COONa 缓冲液, 包含有 PPT 的 CH₃COONa 缓冲液以及包含有丁香酸甲酯的 CH₃COONa 缓冲液中 pH5.5 下都被染上色。可是, 介体仅仅在第二组实验中导致提高耐洗牢度。

实施例 10

在阿托拉斯洗涤槽-O-计量器("LOM")中, 在 pH5.5, 30 °C 下对羊毛染色 1 小时。所染的物质(都是从 Test Fabrics, Inc. 获得的)是精纺羊毛(样式 526, 8cm × 8cm)。

以合适量的 0.1M CH₃COONa 缓冲液(pH5.5)溶解所说的化合物来制备 0.5mg/ml 的第一种化合物(对-苯二胺,“A”)溶液和 0.5mg/ml 的第二种化合物(1-萘酚,“B”)溶液。每只 LOM 烧杯使用 100ml 的总体积。一个烧杯中添加 100ml“**A**”, 另一个烧杯中添加 50ml“**A**”和 50ml“**B**”, 混合形成 100ml。将上文列出的物质的布样在 DI 水中浸湿再在前体溶液中浸透。将具有 180,000POXU/ml 活性的灰盖鬼伞过氧化物酶 (“CiP”)以 0.05 POXU/ml 的浓度添加到每只烧杯中。将 200 或 500μM 过氧化氢加入到每只 LOM 烧杯中。将 LOM 烧杯密封并安装在 LOM 中。在 30 ℃, 42 RPM 下经过 1 小时后停止 LOM。倒掉废液, 并且将布样在冷自来水中冲洗约 15 分钟。室温下干燥布样, 使用 Macbeth ColorEye7000 测定所有布样的 CIELAB 值。结果在表 42-45 中给出。

表 42 - 用前体 A 染色, 200 μM H₂O₂

	L*	a*	b*
羊毛	54.84	1.70	-2.18

表 43 - 用前体 A 染色, 500 μM H₂O₂

	L*	a*	b*
羊毛	43.58	2.50	-4.62

表 44 - 用前体 A 和 B 染色, 200 μM H₂O₂

	L*	a*	b*
羊毛	56.19	2.60	-9.44

表 45 - 用前体 A 和 B 染色, 500 μM H₂O₂

	L*	a*	b*
羊毛	50.48	4.14	-11.68

结果显示使用前体, 过氧化物和灰盖鬼伞过氧化物酶(CiP)可以对羊毛进行染色(用 A 和 A/B 表示紫色)。

实施例 11

在试管中, 在 pH5, 7 和 9 下于室温将铬蓝处理的原料皮革 (Prime Tanning Corp., St. Joseph, MO) 染色 16 小时。

以合适量的 0.1M Britten-Robinson 缓冲液 (B - R 缓冲液) 溶解每种化合物来制备三种 0.5mg/ml 的第一种化合物 (对 - 苯二胺, “ A ”) 溶液 (pH5,7 和 9), 三种 0.5mg/ml 的第二种化合物 (1 - 萘酚, “ B ”) 溶液, 和三种 0.5mg/ml 的第三种化合物 (4 - 羟基肉桂酸, “ C ”) 溶液。

将皮革被染物 (1.5cm × 4cm) 卷起来, 放入 4 英寸的试管中, 每支试管中使用 7ml 的总体积。一支试管中添加 6ml A (或 6ml C), 另一支试管中添加 3ml A 和 3ml B (或 3ml A 和 3ml C), 混合形成 6ml。将具有 690LACU/ml(80LACU/mg) 活性的 *Myceliophthora thermophila* 漆酶 (“ MtL ”) 以 2LACU/ml 的浓度添加到每支试管中 (1ml 酶溶液添加到每支试管中使得每支试管总共 7ml)。将试管密封, 混合并安装在试管旋转器上。于室温在暗橱中将试管温育 16 小时。温育后, 将布样在流动的冷自来水中冲洗 1 分钟并在室温下干燥。

实验结果在表 46 中给出。

表 46

织物	前体	pH5	pH7	pH9
皮革	A	紫色	褐色	褐色
皮革	A/B	深紫色	紫色	紫色
皮革	C	浅绿色	绿色	绿色
皮革	A/C	浅褐色	浅褐色	浅褐色

这些结果表明在 *Myceliophthora thermophila* 漆酶和不同类型前体存在下在一系列 pH 条件下在皮革上形成颜色。

实施例 12

在试管中, 在 pH5, 7 和 9 下于室温将丝绸染色。所染的物质 (从 Test Fabric Inc. 得到) 是真丝双绉 (样式 601, 1.5cm × 4cm)。

以合适量的 0.1M Britten-Robinson 缓冲液 (B - R 缓冲液) 溶解每种化合物来制备三种 0.5mg/ml 的第一种化合物 (对 - 苯二胺, “ A ”) 溶液 (pH5,7 和 9) 和三种 0.5mg/ml 的第二种化合物 (1 - 萘酚, “ B ”) 溶液。

将丝绸被染物卷起来，放入 4 英寸的试管中，每支试管中使用 7ml 的总体积。一支试管中添加 6ml A，另一支试管中添加 3ml A 和 3ml B，混合形成 6ml。将具有 690LACU/ml(80LACU/mg)活性的 *Myceliophthora thermophila* 漆酶(“MtL”)以 2LACU/ml 的浓度添加到每支试管中(1ml 酶溶液添加到每支试管中使得每支试管总共 7ml)。将试管密封，混合并安装在试管旋转器上。于室温在暗橱中将试管温育 16 小时。温育后，将布样在流动的冷自来水中冲洗 1 分钟并在室温下干燥。

实验结果在表 47 中给出。

表 47

织物	前体	pH5	pH7	pH9
丝绸	A	深褐色	深褐色	深紫色
丝绸	A/B	深褐色	深褐色	深褐色

实施例 13

在 0.1M 磷酸钠缓冲液(pH5.5)中溶解 5mg/ml 对苯二胺和添加 2.5%阿拉伯树胶制得印花糊状物。这种印花糊状物利用印花筛框和刮板人工转移到尼龙织物上。将被印花的织物部分用遮盖物覆盖起来。

然后，将织物在蒸汽室中汽蒸 10 分钟并且使其干燥。

将织物浸入 2 LACU/ml 漆酶溶液中，温育 1 小时后颜色显现出来。

实施例 14

单-，二-或多环芳族化合物或杂芳族化合物可以通过浸轧施用于物质上。例如，将 0.5 mg/ml 对-苯二胺溶解在 500ml 0.1M K_2PO_4 缓冲液(pH7)中。漆酶也在同样的缓冲液中稀释。在 60 °C 下利用标准实验室衬垫将对-苯二胺浸轧在所说的物质上。将这种织物汽蒸 10 分钟。然后，用酶溶液可以将汽蒸的物质进行第二次浸轧。在 40 °C 时通过温育这些布样使染料显色。温育后，将布样用连续的热自来水冲洗约 30 秒钟。